

REC'D 11 NOV 2004

WIPO PCT

FOI/0F 2004/014200

22.09.2004.

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 9月29日
Date of Application:

出願番号 特願2003-336793
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-336793]

出願人
Applicant(s):

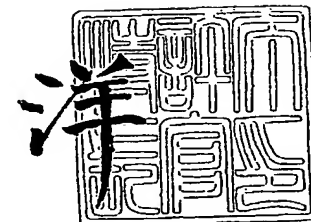
富山県
村口 篤
岸 裕幸
時光 善温
近藤 佐千子

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17 (a) OR (b)

2004年10月29日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-309782C

【書類名】 特許願
【整理番号】 A35117H
【提出日】 平成15年 9月29日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県高岡市二上町 1 5 0 富山県工業技術センター内
 【氏名】 小幡 勤
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県高岡市二上町 1 5 0 富山県工業技術センター内
 【氏名】 鍋沢 浩文
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県高岡市二上町 1 5 0 富山県工業技術センター内
 【氏名】 高林 外広
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県富山市明輪町 1 - 1 0 8 - 1 3 0 1
 【氏名】 村口 篤
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県富山市五福末広町 2 5 5 6 - 4 - 3 - 1 0 1
 【氏名】 岸 裕幸
【発明者】
 【住所又は居所】 富山市萩原 5 5 2 - 1 アクアマリンM306号
 【氏名】 時光 善温
【発明者】
 【住所又は居所】 富山市五福末広町 2 5 5 6 - 4 - 3 - 1 0 3
 【氏名】 近藤 佐千子
【特許出願人】
 【識別番号】 000236920
 【氏名又は名称】 富山県
【特許出願人】
 【識別番号】 502413278
 【氏名又は名称】 村口 篤
【特許出願人】
 【識別番号】 502413289
 【氏名又は名称】 岸 裕幸
【特許出願人】
 【住所又は居所】 富山市萩原 5 5 2 - 1 アクアマリンM306号
 【氏名又は名称】 時光 善温
【特許出願人】
 【住所又は居所】 富山市五福末広町 2 5 5 6 - 4 - 3 - 1 0 3
 【氏名又は名称】 近藤 佐千子
【代理人】
 【識別番号】 110000109
 【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス
 【代表者】 今村 正純
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 170347
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1

【物件名】
【物件名】

図面 1
要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

基板の一方の主表面に複数個のマイクロウェルを有し、前記マイクロウェルは、1つのマイクロウェルに1つの生体細胞のみが格納される形状及び寸法を有するマイクロウェルアレイチップであって、前記マイクロウェルの開口部に、開口部を狭めるように突起部を有するマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 2】

前記突起部は、基板表面に設けられた膜が前記開口部に突出するように形成されている請求項 1 に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 3】

前記突起部により形成される開口の大きさは、マイクロウェルに格納されるべき生体細胞が通過し得る大きさである請求項 1 または 2 に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 4】

基板がシリコン、金属または樹脂製である請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 5】

基板表面に設けられた膜が、酸化膜、窒化膜、不純物拡散層、金属膜または樹脂膜である請求項 2～4 のいずれか 1 項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 6】

基板の少なくとも一方の主表面に膜を形成する工程、
形成した膜の上に、レジストを塗布する工程、
前記レジスト面にマイクロウェルパターンを有するマスクを介して露光し、レジストの非硬化部分を除去する工程、
前記膜及び基板の露出部をエッチングしてマイクロウェルアレイ形状の穴を空ける工程、
及び
レジストを除去する工程、
を含む請求項 1 に記載のマイクロウェルアレイチップの製造方法。
製造方法。

【請求項 7】

基板がシリコン、金属または樹脂製である請求項 6 に記載のマイクロウェルアレイチップの製造方法。

【請求項 8】

基板表面に設けられた膜が、酸化膜、窒化膜、不純物拡散層、金属膜または樹脂膜である請求項 6 または 7 に記載のマイクロウェルアレイチップの製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】マイクロウェルアレイチップ及びその製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、マイクロウェルへの生体細胞の捕集率及び採集率に優れたマイクロウェルアレイチップ及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、抗原特異的リンパ球は、例えば、96穴プレートを用いて、1穴あたり約200,000個のリンパ球を加えて3日から1週間、抗原の存在下で培養することにより検出していた（非特許文献1及び2）。この方法では、約200,000個と言うリンパ球集団の中に抗原特異的リンパ球が存在することは確認できた。しかし、リンパ球集団中に存在する個々の抗原特異的リンパ球を同定することはできなかった。

【0003】

これに対して近年、蛍光色素で標識した抗原分子をリンパ球と混ぜ合わせるにより、抗原特異的リンパ球の抗原受容体に蛍光標識抗原を結合させ、蛍光標識抗原を結合したリンパ球を、フローサイトメータを用いることにより検出する方法が開発され利用されている（非特許文献3）。この方法では抗原に結合する1個のリンパ球を同定することが可能である。さらに抗原に結合する1個のリンパ球を分取することも可能である。

【0004】

しかしながら、上記検出方法では、分取するためにはセルソーターという高価で複雑な機器が必要である上に、以下の問題も有る。

(1) 分取するための機器の条件設定が難しく、細胞を分取するためには機器操作の熟練を要する。

(2) バックグラウンドが高いため抗原特異的リンパ球の頻度が0.1%以下の場合には抗原特異的リンパ球を検出できない。

(3) 細胞を分取する効率は低い。

(4) 頻度の低い細胞を分取するのに時間がかかる。

(5) 抗原が結合することは確認できるが、抗原が結合したリンパ球の反応を解析することは難しい。

【0005】

別の抗原特異的リンパ球検出法として、磁気ビーズに結合した抗原分子をリンパ球と混ぜ合わせるにより、抗原特異的リンパ球の抗原受容体に磁気ビーズ結合抗原を結合させ、磁石を用いて抗原特異的リンパ球を分取する方法も開発されている（非特許文献4）。

この方法では、複雑な装置は必要とせず、細胞の分取の時間は短時間であり、抗原が結合することも確認できる。しかし、抗原が結合したリンパ球が抗原に反応（細胞内シグナル伝達、RNA合成、タンパク質合成などの細胞の代謝生理反応）するかを解析することはできなかった。また、抗原特異的リンパ球の頻度が0.1%以下の場合には抗原特異的リンパ球を検出できなかった。

【非特許文献1】「リンパ球機能検索法」矢野純一、藤原道夫編著、中外医学社（1994年）

【非特許文献2】「免疫実験操作法Ⅰ、Ⅱ」右田俊介、紺田進、本庶佑、濱岡利之編集、南江堂（1995年）

【非特許文献3】Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, Science, 274:94-96, 1996

【非特許文献4】Abts H, Emmerich M, Miltenyi S, Radbruch A, Tesch H, CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. Journal of Immunol

ogical Methods 125:19-28, 1989.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

それに対して、本発明者らは、複雑な装置は必要とせず、細胞の分取の時間は短時間であり、抗原が結合することも確認でき、頻度の低い抗原特異的リンパ球(0.001%以上)も検出でき、抗原が結合したリンパ球が抗原に反応するかを解析することができ、しかも抗原特異的リンパ球を分取できる抗原特異的リンパ球検出法を提供することを種々検討してきた。そして、1つ1つのリンパ球の抗原特異性を個別に検出し、さらに検出された抗原特異的リンパ球を回収する方法について開発を進めてきた。

しかし、従来は、1つ1つのリンパ球の抗原特異性を個別に検出し、さらに検出された抗原特異的リンパ球を回収することができるマイクロウェルアレイチップは知られていなかった。

【0007】

そこで本発明者らは、上記検出法に利用可能な、1つのリンパ球を1つのマイクロウェルに収納可能なマイクロウェルアレイチップを提供すべく種々の検討を重ねてきた。そして、基板表面に1つのリンパ球を収納できる程度の大きさのマイクロウェルを形成したマイクロウェルアレイチップを試作し、リンパ球のマイクロウェルへの格納(捕集)、及びマイクロウェルからの回収テストを行ってきた。その過程で、リンパ球をマイクロウェルへ格納する際、細胞懸濁液を用いてリンパ球をマイクロウェルに捕集した後、アレイチップを洗浄すると、大多数の細胞がマイクロウェルより流れ出してしまい、捕集率及び充填率が著しく低下するという問題があることが判明した。

【0008】

そこで本発明の目的は、マイクロウェルに捕集されたリンパ球等の細胞が、その後の洗浄の際に、マイクロウェルから流出しにくいマイクロウェルアレイチップを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題を解決するための本発明は、以下の通りである。

【請求項1】 基板の一方の主表面に複数個のマイクロウェルを有し、前記マイクロウェルは、1つのマイクロウェルに1つの生体細胞のみが格納される形状及び寸法を有するマイクロウェルアレイチップであって、前記マイクロウェルの開口部に、開口部を狭めるように突起部を有するマイクロウェルアレイチップ。

【請求項2】 前記突起部は、基板表面に設けられた膜が前記開口部に突出するように形成されている請求項1に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項3】 前記突起部により形成される開口の大きさは、マイクロウェルに格納されるべき生体細胞が通過し得る大きさである請求項1または2に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項4】 基板がシリコン、金属または樹脂製である請求項1～3のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項5】 基板表面に設けられた膜が、酸化膜、窒化膜、不純物拡散層、金属膜または樹脂膜である請求項2～4のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項6】 基板の少なくとも一方の主表面に膜を形成する工程、
形成した膜の上に、レジストを塗布する工程、
前記レジスト面にマイクロウェルパターンを有するマスクを介して露光し、レジストの非硬化部分を除去する工程、
前記膜及び基板の露出部をエッチングしてマイクロウェルアレイ形状の穴を空ける工程、
及び

レジストを除去する工程、

を含む請求項1に記載のマイクロウェルアレイチップの製造方法。

【請求項 7】基板がシリコン、金属または樹脂製である請求項 6 に記載のマイクロウェルアレイチップの製造方法。

【請求項 8】基板表面に設けられた膜が、酸化膜、窒化膜、不純物拡散層、金属膜または樹脂膜である請求項 6 または 7 に記載のマイクロウェルアレイチップの製造方法。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、一度ウェル内に入った細胞はウェル上面の突起（底）に引っかかるため、洗浄時にウェル外へ流失せずウェル内に高い確率で留まることができる。例えば、ウェルが逆ピラミッド構造の場合、底を形成することでチップ表面及び、ウェル内部の流体分布が変わるため、洗浄などの際に一度入った細胞が流体とともに流れでないようにすることができる。さらに、一度ウェルに入った細胞は、再びウェルの外に出ようとしても底に引っかってウェルに留まりやすくなる。

【0011】

また、ウェルに入った細胞を取り出す際も、ウェル形状を工夫することで吸引の際に生じる細胞とウェル表面の負圧発生を抑えることが可能になる。即ち、ウェル形状を逆ピラミッド構造にすると、稜線部分が圧力抜き機能をもつことになり、細胞を吸引した際に、ウェルと細胞間が真空にならない様にする事ができ、細胞の採取を容易にすることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明のマイクロウェルアレイチップは、基板の一方の主表面に複数のマイクロウェルを有し、前記マイクロウェルは、1つのマイクロウェルに1つの生体細胞のみが格納される形状及び寸法を有するマイクロウェルアレイチップであって、前記マイクロウェルの開口部に、開口部を狭めるように突起部を有する。

【0013】

前記突起部は、基板表面に設けられた膜が前記開口部に突出するように形成されていることができる。但し、前記突起部は、この態様に限定されるものではない。前記突起部は、基板表面に設けられた膜が前記開口部に突出するように形成されている態様について、図 1 に基づいて以下に説明する。

図 1 の（A）及び（B）は、基板 1 の表面に膜 2 が設けられ、さらにマイクロウェル 3 を有するアレイチップの平面図及び側面断面図である。マイクロウェル 3 の開口部 3 a には突起部は存在しない。

それに対して、図 1 の（C）、（D）及び（E）は、基板 1 の表面に膜 2' が設けられ、さらにマイクロウェル 3 を有するアレイチップの平面図、側面断面図及び斜視図である。マイクロウェル 3 の開口部 3 a には、膜 2' の一部で形成される突起部 4 が存在する。

【0014】

また、図 2 の（A）、（B）及び（C）には、図 1 とは別の本発明のマイクロウェルアレイチップの態様を示す平面図、側面断面図及び斜視図を示す。図 2 の（A）、（B）及び（C）は、基板 1 の表面に膜 2'' が設けられ、さらにマイクロウェル 3 を有するアレイチップであって、マイクロウェル 3 の開口部 3 a には、膜 2'' の一部で形成される突起部 4' が存在する。突起部 4' で形成される開口の形状が、図 1 の（E）（四角形）と異なり、円形である。

突起部により形成される開口の形状は、図 1 の突起部 4 及び図 2 の突起部 4' 以外の形状であっても良い。また、突起部により形成される開口の大きさは、マイクロウェルに格納されるべき生体細胞が通過し得る大きさであることが適当である。

【0015】

さらに図 3 には、マイクロウェルの形状が異なる本発明のマイクロウェルアレイチップの態様を示す側面断面図を示す。

図 3（C）は、上記図 1 及び 2 と同様の態様であり、マイクロウェルは逆四角錐状であるのに対して、図 3（D）のマイクロウェルは方形であり、図 3（E）のマイクロウェル

は半球形である。但し、マイクロウエルの形状には特に制限はなく、これら以外の形状であって良い。

【0016】

マイクロウエルの形状や寸法には特に制限はないが、マイクロウエルの形状は、例えば、円筒形であることができ、円筒形以外に、複数の面により構成される多面体(例えば、直方体、六角柱、八角柱等)、逆円錐形、逆角錐形(逆三角錐形、逆四角錐形、逆五角錐形、逆六角錐形、七角以上の逆多角錐形)等であることもでき、これらの形状の二つ以上を組み合わせた形状であることもできる。例えば、一部が円筒形であり、残りが逆円錐形であることができる。また、逆円錐形、逆角錐形の場合、底面がマイクロウエルの開口となるが、逆円錐形、逆角錐形の頂上から一部を切り取った形状である(その場合、マイクロウエルの底部は平坦になる)こともできる。円筒形、直方体は、マイクロウエルの底部は通常、平坦であるが、曲面(凸面や凹面)とすることもできる。マイクロウエルの底部を曲面とすることができるのは、逆円錐形、逆角錐形の頂上から一部を切り取った形状の場合も同様である。

【0017】

マイクロウエルの形状や寸法は、マイクロウエルに格納されるべき生体細胞の種類(生体細胞の形状や寸法等)を考慮して、1つのマイクロウエルに1つの生体細胞が格納されるように、適宜決定される。

【0018】

1つのマイクロウエルに1つの生体細胞が格納されるようにするためには、例えば、マイクロウエルの開口部に設けられた突起により形成される開口の平面形状に内接する最大円の直径が、マイクロウエルに格納しようとする生体細胞の直径の1~2倍の範囲、好ましくは1.1~1.9倍の範囲、より好ましくは1.2~1.8倍の範囲であることが適当である。

また、マイクロウエルの深さは、マイクロウエルに格納しようとする生体細胞の直径の1~4倍の範囲、好ましくは1.1~1.9倍の範囲、より好ましくは1.2~1.8倍の範囲であることが適当である。

【0019】

マイクロウエルが円筒形の場合、その寸法は、例えば、直径5~100 μ mであることができ、生体細胞がBリンパ球の場合、好ましくは、直径は5~15 μ mである。また、深さは、例えば、5~100 μ mであることができ、生体細胞がBリンパ球の場合、好ましくは、深さは5~40 μ mであることができる。但し、マイクロウエルの寸法は、上述のように、マイクロウエルに格納しようとする生体細胞の直径とのマイクロウエルの寸法の好適な比を考慮して適宜決定する。

【0020】

1つのマイクロウエルアレイチップが有するマイクロウエルの数は、特に制限はないが、生体細胞がリンパ球の場合、抗原特異的リンパ球の頻度が 10^5 個に1個から多い場合には約500個であるという観点から、1cm²当たり、例えば、2,000~1,000,000個の範囲であることができる。

【0021】

本発明のマイクロウエルアレイチップを構成する基板は、例えば、シリコン、金属または樹脂製であることができる。但し、シリコン製であることで、現在半導体集積回路制作技術の主流であるシリコン加工技術をそのまま応用することが可能であり、特に微細加工性、量産性、将来のセンサーを含む分析回路との集積化という意味で他の材料より優れている。

基板を構成する金属としては、例えば、アルミニウム、ステンレス、銅、ニッケル、クロム、チタン等を挙げることができる。

基板を構成する樹脂としては、例えば、ポリイミド、ポリエチレン、塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリカーボネート、アクリル、ポリエチレンテレフタレート等を挙げることができる。

【0022】

また、基板表面に設けられた膜は、例えば、酸化膜、窒化膜、不純物拡散層、金属膜または樹脂膜であることができる。

酸化膜としては例えば、酸化シリコン膜、窒化酸化シリコン膜、酸化アルミニウム膜、酸化チタン膜を挙げることができる。

窒化膜として窒化シリコン膜、窒化アルミニウム膜、窒化チタン膜を挙げることができる。

不純物拡散層として、シリコン基板表面に高濃度にボロンを分布させたものを挙げることができる。

金属膜としては、例えば、アルミニウム、金、白金、ステンレス、銅、ニッケル、クロム、チタン、ゲルマニウム、シリコンゲルマニウム等を挙げることができる。

樹脂膜としては、例えば、ポリイミド、ポリエチレン、塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリカーボネート、アクリル、ポリエチレンテレフタレート等を挙げることができる。

【0023】

基板表面に設けられる膜の厚みは、特に制限はないが、例えば、100nmから5 μ mの範囲である。好ましくは、300nmから1 μ mの範囲である。

【0024】

基板がシリコン製である場合、基板表面に設けられる膜の種類は、現在主流の集積回路製造技術をそのまま応用可能であり、量産性、低コスト化、信頼性という観点からは、酸化膜、窒化膜、不純物拡散層であることが好ましい。

また、基板がシリコン製の場合、フォトリソグラフィの応用や、エッチング選択性、量産性などという観点からは、基板表面に設けられる膜は樹脂製であることが好ましい。

また、基板がシリコン製の場合、フォトリソグラフィの応用や、センサとの複合化、膜の耐久性、量産性などという点からは、基板表面に設けられる膜は金属製であることが好ましい。

【0025】

基板が金属製の場合、エッチング選択性や、膜の耐熱性、耐久性などの向上という観点からは、基板表面に設けられる膜は金属製であることが好ましい。

また、基板が金属製の場合、フォトリソグラフィの応用や、エッチング選択性などという観点からは、基板表面に設けられる膜は樹脂製であることが好ましい。

基板が金属製の場合、成膜の容易性、膜の耐久性や密着性などの観点からは、基板表面に設けられる膜は酸化膜、窒化膜等であることが好ましい。

【0026】

基板が樹脂製の場合、低コスト化や公知である様々な成形、加工技術を利用し製造できるという観点からは、基板表面に設けられる膜は樹脂製であることが好ましい。

基板が樹脂製の場合、膜の機能性、加工性、耐久性などの観点からは、基板表面に設けられる膜は金属製であることが好ましい。

【0027】

[マイクロウェルアレイチップの製造方法]

本発明のマイクロウェルアレイチップは、例えば、以下の方法により製造することができる。

基板の少なくとも一方の主表面に膜を形成する工程、

形成した膜の上に、レジストを塗布する工程、

前記レジスト面にマイクロウェルパターンを有するマスクを介して露光し、レジストの非硬化部分を除去する工程、

前記膜及び基板の露出部をエッチングしてマイクロウェルアレイ形状の穴を空ける工程、及び

レジストを除去する工程、

を含む本発明のマイクロウェルアレイチップの製造方法。

【0028】

基板が、シリコン製の場合について説明する。

(1) 洗浄したシリコン基板表面上に熱CVD、CVD等の方法によって酸化膜等の薄膜を形成する。

(2) 形成した薄膜の上に、レジストを塗布する。

(3) レジスト面にマイクロウェルパターンを有するマスクを介して露光し、レジストの非硬化部分を除去する。即ち、フォトリソグラフィにより、薄膜上にマイクロウェルパターンを形成し、シリコン表面を露出させる。

(4) 膜及び基板の露出部をエッチングしてマイクロウェルアレイ形状の穴を空ける。エッチングは、例えば、アルカリエッチング溶液（たとえば、TMAH：テトラメチルアンモニウムハイドライドなど）を用いて行うことができる。このとき、エッチングは基板厚み方向と、薄膜下方向に向かって進む。ここで規定時間以上のエッチングをおこなうと、シリコン基板に形成されたマイクロウェルの入り口に、薄膜の庇状の突起が形成される。

(5) レジストを除去し、本発明のマイクロウェルアレイチップが得られる。
基板が金属製の場合について説明する。

【0029】

(1) 洗浄した金属基板表面上に、樹脂、あるいは基板とエッチング選択性のある金属薄膜を形成するか、あるいは金属基板表面を酸化処理、窒化処理をして薄膜形成をする。

(2) 形成した薄膜の上にフォトレジストを塗布する。

(3) フォトレジスト面にマイクロウェルパターンを有するフォトマスクを介して露光し、フォトレジストの未硬化部分を除去する。すなわち、フォトリソグラフィにより、薄膜上にマイクロウェルパターンを形成し、基板表面を露出させる。

(4) 基板の露出した部分をエッチングなどの方法でマイクロウェルアレイ形状に穴を開ける。このとき、エッチング手段は適宜選択する。

(5) ここで、底部方向へエッチングが進むとともに薄膜直下横方向も若干エッチングされるので、庇構造が形成される。

(6) フォトレジストを取り除くと、本発明によるマイクロウェルアレイチップが得られる。

【0030】

基板が樹脂製の場合について説明する。

(1) 洗浄した樹脂基板上に、樹脂、あるいは金属薄膜を形成、あるいは樹脂表面を耐性向上させる様な改質処理する。その改質処理は例えば、UV処理や、改質材料の注入などである。

(2) 形成した薄膜の上にフォトレジストを塗布する。

(3) フォトレジスト面にマイクロウェルパターンを有するフォトマスクを介して露光し、フォトレジストの未硬化部分を除去する。すなわち、フォトリソグラフィにより、薄膜上にマイクロウェルパターンを形成し、基板表面を露出させる。

(4) 基板の露出した部分を溶解などによる方法でマイクロウェルアレイ形状に穴を開ける。このとき、エッチングに使う溶液は適宜選択する。あるいは、基板自身が、フォトリソグラフィ可能であれば、例えば、マイクロウェルパターンの金属薄膜をマスクとして、UV露光、露光部分を除去することも可能である。このとき、ウェルの深さは、UV露光量によって制御できる。

(5) ここで、底部方向へ溶解が進むとともに薄膜直下横方向も若干エッチングされるので、庇構造が形成される。

(6) フォトレジストを取り除くと、本発明によるマイクロウェルアレイチップが得られる。

【0031】

シリコン基板においてその表面に酸化膜を設けた場合について説明する。

(1) 洗浄したシリコン基板上に熱酸化、熱CVD、プラズマCVD等の方法によって酸化膜（酸化シリコン膜等）を形成する。

(2) 形成した薄膜の上に、フォトレジストを塗布する。

(3) フォトリソグレイ面にマイクロウェルパターンを有するマスクを介してUV露光し、フォトリソグレイの未硬化部分を除去する。すなわち、フォトリソグラフィにより、薄膜上にマイクロウェルパターンを形成し、シリコン表面を露出させる。フォトリソグレイは除去する。

(4) 基板の露出部分をエッチングしてマイクロウェルアレイ形状の穴を空ける。エッチングは、例えば、アルカリエッチング溶液（例えば、TMAH：テトラメチルアンモニウムハイドライドなど）を用いて行うことができる。この時、エッチングは基板厚み方向と、薄膜直下横方向に進む。ここで規定時間以上のエッチングを行うと、シリコン基板に形成されたマイクロウェルの入り口に、薄膜の庇状の突起が形成される。

(5) これにより、本発明のマイクロウェルアレイチップが得られる。

【0032】

シリコン基板においてその表面に金属薄膜を設けた場合について説明する。

(1) シリコン基板上に、CVD、抵抗加熱蒸着、スパッタ蒸着、電子線蒸着などにより金属薄膜を形成する。

(2) 形成した薄膜の上に、フォトリソグレイを塗布する。

(3) フォトリソグレイ面にマイクロウェルパターンを有するマスクを介してUV露光し、フォトリソグレイの未硬化部分を除去する。すなわち、フォトリソグラフィにより、薄膜上にマイクロウェルパターンを形成し、シリコン表面を露出させる。このとき、パターンを形成するために薄膜をエッチングするための方法は適宜選択する。例えば、アルミニウムの場合は、リン酸+硝酸+酢酸+水の混酸を使用する。ここで必要な場合は、フォトリソグレイを取り除く。

(4) 基板の露出部分をエッチングしてマイクロウェルアレイ形状の穴を空ける。エッチングは、例えば、アルカリエッチング溶液などを用いて行うことができる。エッチング溶液等は、適宜選択する。例えば、アルミニウム薄膜による構造を作製する場合は、シリコンエッチングして、アルミニウムをエッチングしないエッチング溶液（例えば、ヒドラジン水和物を選択する。ヒドラジンは大部分の金属を侵さない）を用いる。この時、エッチングは基板厚み方向と、薄膜直下横方向に進む。ここで規定時間以上のエッチングを行うと、シリコン基板に形成されたマイクロウェルの入り口に、薄膜の庇状の突起が形成される。

(5) これにより、本発明のマイクロウェルアレイチップが得られる。

【0033】

シリコン基板においてその表面に樹脂薄膜を設けた場合について説明する。

(1) 洗浄したシリコン基板上に、CVD、塗布、ディッピングなどの方法により、樹脂薄膜を形成する。

(2) 形成した薄膜上にフォトリソグレイを塗布する。フォトリソグレイ面にマイクロウェルパターンを有するマスクを介してUV露光し、フォトリソグレイの未硬化部分を除去する。すなわち、フォトリソグラフィにより、薄膜上にマイクロウェルパターンを形成し、シリコン表面を露出させる。このとき、パターンを形成するために樹脂薄膜を除去するための方法は適宜選択する。例えば、感光性ポリイミド薄膜を用いた場合、塗布形成された樹脂薄膜そのものがパターン形成能力を持つので、フォトリソグレイ塗布工程を省き、露光現像のみの工程で樹脂薄膜の加工が可能である。

(3) 基板の露出部分をエッチングしてマイクロウェルアレイ形状の穴を空ける。エッチングは、例えば、アルカリエッチング溶液などを用いて行うことができる。エッチング溶液は、適宜選択する。例えば、ポリイミド薄膜の場合は、ヒドラジン水和物、エチレンジアミンピロカテコールを選択することができる。この時、エッチングは基板厚み方向と、薄膜直下横方向に進む。ここで規定時間以上のエッチングを行うと、シリコン基板に形成されたマイクロウェルの入り口に、薄膜の庇状の突起が形成される。

(4) これにより、本発明のマイクロウェルアレイチップが得られる。

【0034】

シリコン基板においてその表面に窒化シリコン膜を設けた場合について説明する。

(1) 洗浄したシリコン基板上に、CVD、スパッタ蒸着等の方法により、窒化シリコン薄膜を形成する。

(2) 形成した薄膜の上に、フォトレジストを塗布する。

(3) フォトレジスト面にマイクロウェルパターンを有するマスクを介してUV露光し、フォトレジストの未硬化部分を除去する。すなわち、フォトリソグラフィにより、薄膜上にマイクロウェルパターンを形成し、シリコン表面を露出させる。フォトレジストを除去する。

(4) 基板の露出部分をエッチングしてマイクロウェルアレイ形状の穴を空ける。エッチングは、例えば、アルカリエッチング溶液（例えば、TMAH：テトラメチルアンモニウムハイドライドなど）を用いて行うことができる。この時、エッチングは基板厚み方向と、薄膜直下横方向に進む。ここで規定時間以上のエッチングを行うと、シリコン基板に形成されたマイクロウェルの入り口に、薄膜の庇状の突起が形成される。

(5) これにより、本発明のマイクロウェルアレイチップが得られる。

【0035】

シリコン基板においてその表面に不純物拡散膜を設けた場合について説明する。

(1) 洗浄したシリコン基板上に、フォトレジストを塗布する。

フォトレジスト面にマイクロウェルパターンを有するマスクを介してUV露光し、フォトレジストの未硬化部分を除去する。すなわち、フォトリソグラフィにより、薄膜上にマイクロウェルパターンを形成し、ウェルパターン部分以外のシリコン表面を露出させる。

(2) 基板を洗浄して、熱拡散炉、イオン打ち込みなどの方法によって、シリコンが露出した部分にボロンを高濃度に（ $\sim 10^{20}/\text{cm}^2$ 程度）拡散する。拡散源は、ボロン以外にゲルマニウム、シリコンゲルマニウムなどでもよい。拡散を深くするための熱処理（ドライブイン）によって拡散層厚を制御することができる。この際、熱処理炉に酸素を導入して表面に酸化シリコン膜を形成する。

(3) ウェルのエッチングは、例えば、アルカリエッチング溶液（例えば、TMAH：テトラメチルアンモニウムハイドライドなど）を用いて行うことができる。この時、ボロンを未拡散のシリコン表面はエッチングされやすいが、ボロンが高濃度に拡散されたシリコン表面はエッチングされにくい。よってエッチングは、ボロンを拡散していないウェルパターン部分に対して選択的に進む。またエッチングは基板厚み方向と、薄膜直下横方向に進む。ここで規定時間以上のエッチングを行うと、シリコン基板に形成されたマイクロウェルの入り口に、薄膜の庇状の突起が形成される。

(4) これにより、本発明のマイクロウェルアレイチップが得られる。

【実施例】

【0036】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

（庇構造実施例）

図1に本発明によって作製されたマイクロウェル構造を示す。

本構造は半導体基板、樹脂基板などとの加工時における上面薄膜との材料加工容易さの選択性があれば実現できる。（100）面シリコン基板1表面上に形成されるマイクロウェル3は、開口径、深さともに数ミクロン～数十ミクロンである。ウェルが形成されていない表面は酸化膜や、金属等の薄膜層2'に覆われている。基板をエッチングすることで形成されるウェルの開口部3aには、薄膜層2'による庇状の突起部4が付属している。薄膜層2'の厚みは、数百ナノメートルから数ミクロンで形成時に制御されている。薄膜層2'によって形成される庇状の突起部4はマイクロウェル3をエッチング形成する際に、薄膜層2'があまりエッチングされずかつ、基板に対しても薄膜層2'の下部までエッチングするようなエッチャント手法によって実現される。

【0037】

本実施例では、例えば代表的な半導体基板であるシリコンを用いてその作製過程を図3において説明する。

(1) (100) シリコン基板1を熱酸化し、表面に～数 μm 程度の薄膜層2を形成する。〔

図3 (A)]

(2) フォトリソグラフィ工程にて、ウェルパターン5をシリコン基板1に転写、ウェル部分のみシリコンを露出させる。[図3 (B)]

(3) 水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液 (90℃、25%) 中に、シリコンを数十分間浸漬させエッチングをおこなう。エッチング時間は、所望のウェルの深さdと底の大きさwによって決定される。

(4) 規定の時間エッチングしたら、エッチング溶液よりシリコン基板を取り出す。

【0038】

以上の工程を経て図3(C)の構造が形成可能である。ここで用いられた水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液は、酸化膜のエッチングが遅くウェル側面方向のエッチングがすすむ為、酸化膜下の中空構造を可能にする。

また、本発明のマイクロウェルアレイチップは、図3 (D) 及び (E) の構造の物であってもよい。図3 (D) 及び (E) の構造のマイクロウェルを有するアレイチップは、上記方法を以下のように変更することで形成できる。

【0039】

例えば、シリコン基板を選択した場合、図3 (D) は、RIEドライエッチングや、基板面方位やウェルパターンを適宜選択することで実現される。例えば、基板面方位を(100)や(110)、(111)面とし、基板表面に対して垂直なエッチング面が現れるようなパターン形状を選択することで可能である。図3 (E) は、等方性エッチング特性を示すエッチング方法によって実現される。例えば、通常のドライエッチングやフッ酸と硝酸の混合液によるエッチングでは、シリコンは等方的にエッチングされるため、本発明の構造が容易に得られる。

【0040】

なお、薄膜層は酸化膜に限らず、高濃度不純物拡散されたシリコン、ゲルマニウム、シリコンゲルマニウム、金属薄膜、樹脂等などへの変更が可能である。また、エッチングはウエットエッチング、ドライエッチング等のいずれでもかまわない。ウエットエッチングにおいては、基板を一括にて処理することが可能であるので、製品量産効率が優れている。

【0041】

上記方法で得られるマイクロウェルアレイチップの各寸法(図4に示す)を表1に記載のように変更したときのマイクロウェルアレイチップアレイ率(充填率)を評価した。結果を表1に示す。播種した細胞濃度は 10^5 cells/ μ Lである。

【0042】

細胞アレイ率(充填率)評価方法

1. マウスからリンパ球を採取。このとき、得られる細胞の濃度は、1マイクロリッターあたり $10^4 \sim 10^5$ 細胞 ($10^4 \sim 10^5$ cells/ μ l) である。細胞は保存するために、HBSS (Hanks' balanced salt solution) に入れておく。
2. 各細胞に蛍光染色をおこなう。各細胞を、測定に使用する蛍光スキャナーの励起波長(532nm)に対して蛍光を発するCellTracker Orangeで染色をおこなう。
3. 染色した細胞をマイクロピペットでシリコンチップ上に播種する。播種は3回繰り返す、最後にウェルに入らなかった細胞を洗浄によって取り除く。
4. チップが乾燥しないようにカバーガラスで覆い、マイクロアレイスキャナーにて蛍光強度を読みとる。
5. チップ上の4500ウェルを選択し、そのうち蛍光発光しているウェルの数を数える。アレイ率(充填率)は以下の式で算出する。

$$\text{アレイ率(充填率)} = (\text{蛍光を発しているウェル数}/4500) \times 100$$

【0043】

【表 1】

サンプルの底及びウェルの寸法とアレイ（充填）率との関係

	d	p	2r	W1	W2	アレイ（充填）率
サンプルA	9.2 μm	13.0 μm	12 μm	0.5 μm	2.7 μm	~73%
サンプルB	11.8 μm	16.7 μm	13.9 μm	1.4 μm	5.0 μm	~24.9%

【0044】

サンプルA及びBについて、底及びウェルの寸法の違いによるアレイ（充填）率がどのように変化するか検討した。その結果、細胞が直径8 μm のである場合、サンプルBのアレイ（充填）率は、サンプルAのアレイ（充填）率より劣っていた。これは、サンプルBの開口径2rが大きすぎるためであると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0045】

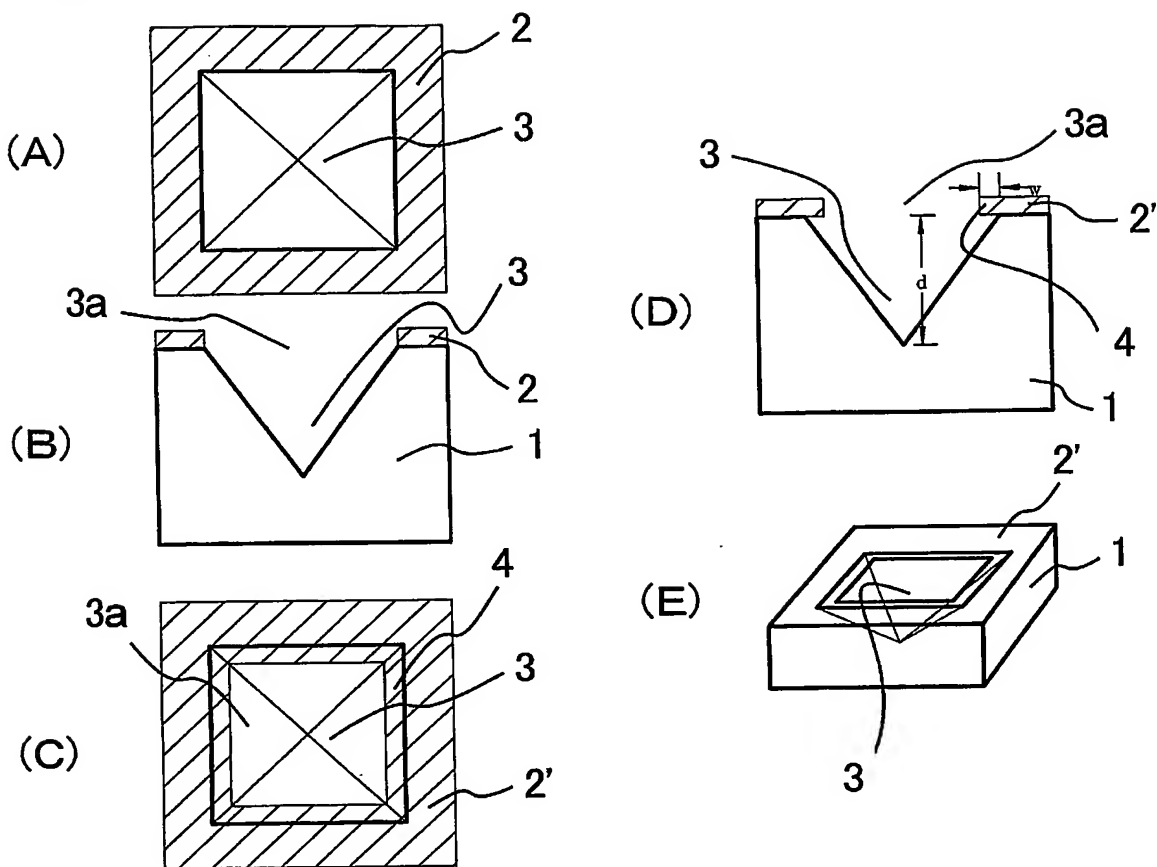
【図1】（A）及び（B）は、開口部3aに突起部が存在しないマイクロウェル3を有するアレイチップの平面図及び側面断面図である。（C）、（D）及び（E）は、マイクロウェル3の開口部3aに膜2'の一部で形成される突起部4が存在するアレイチップの平面図、側面断面図及び斜視図である。

【図2】（A）、（B）及び（C）は、図1とは別の態様の本発明のマイクロウェルアレイチップを示す平面図、側面断面図及び斜視図である。マイクロウェル3の開口部3aには、膜2'の一部で形成される突起部4'が存在し、突起部4'で形成される開口の形状は円形である。

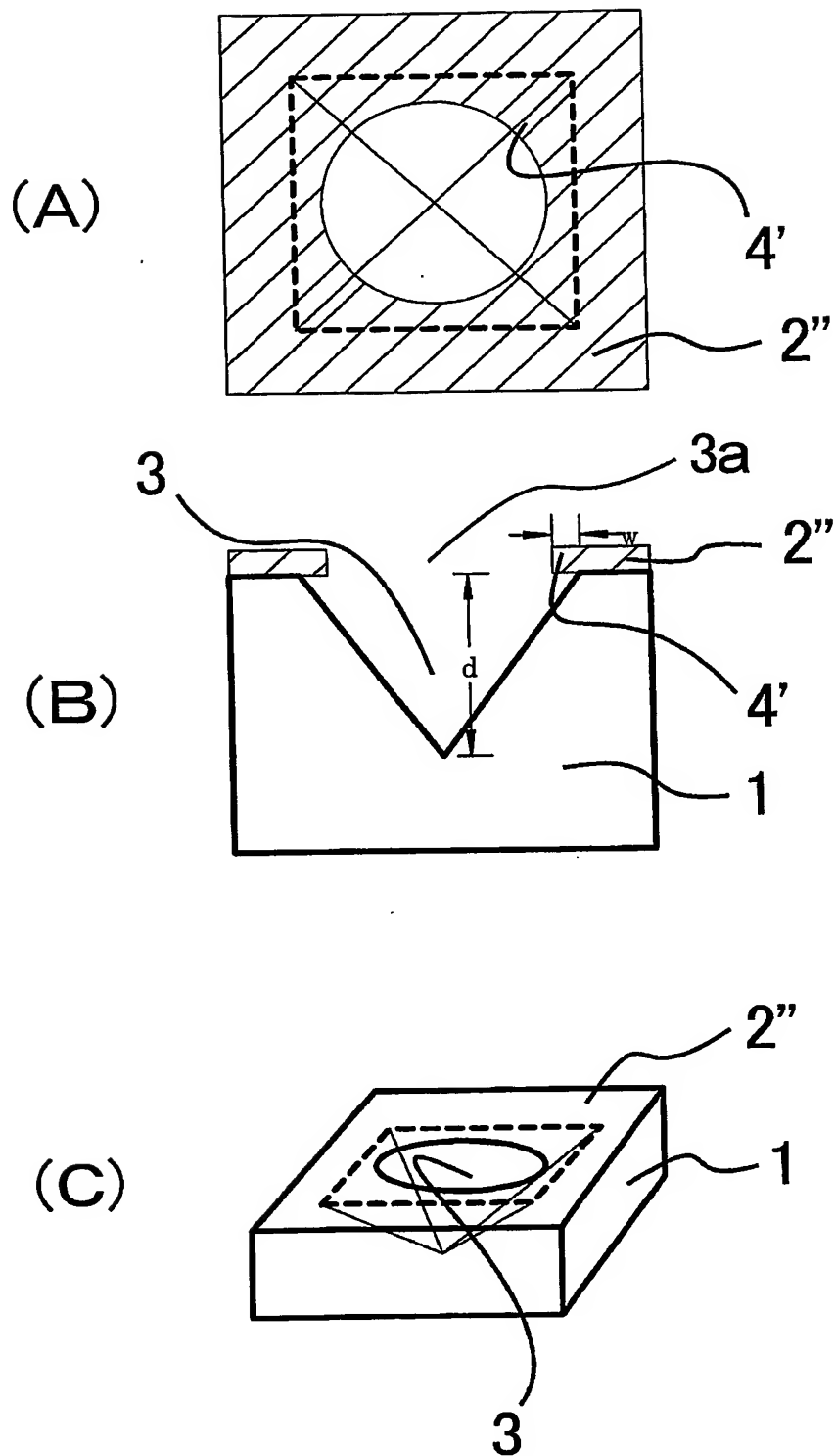
【図3】（A）、（B）及び（C）はシリコン基板を用いたマイクロウェルアレイチップの作製過程の説明図（側面断面図）であり、（C）のマイクロウェルは逆四角錐状である。（D）のマイクロウェルは方形であり、（E）のマイクロウェルは半球形である。

【図4】実施例で作成したマイクロウェルアレイチップの各部分の寸法を示す。

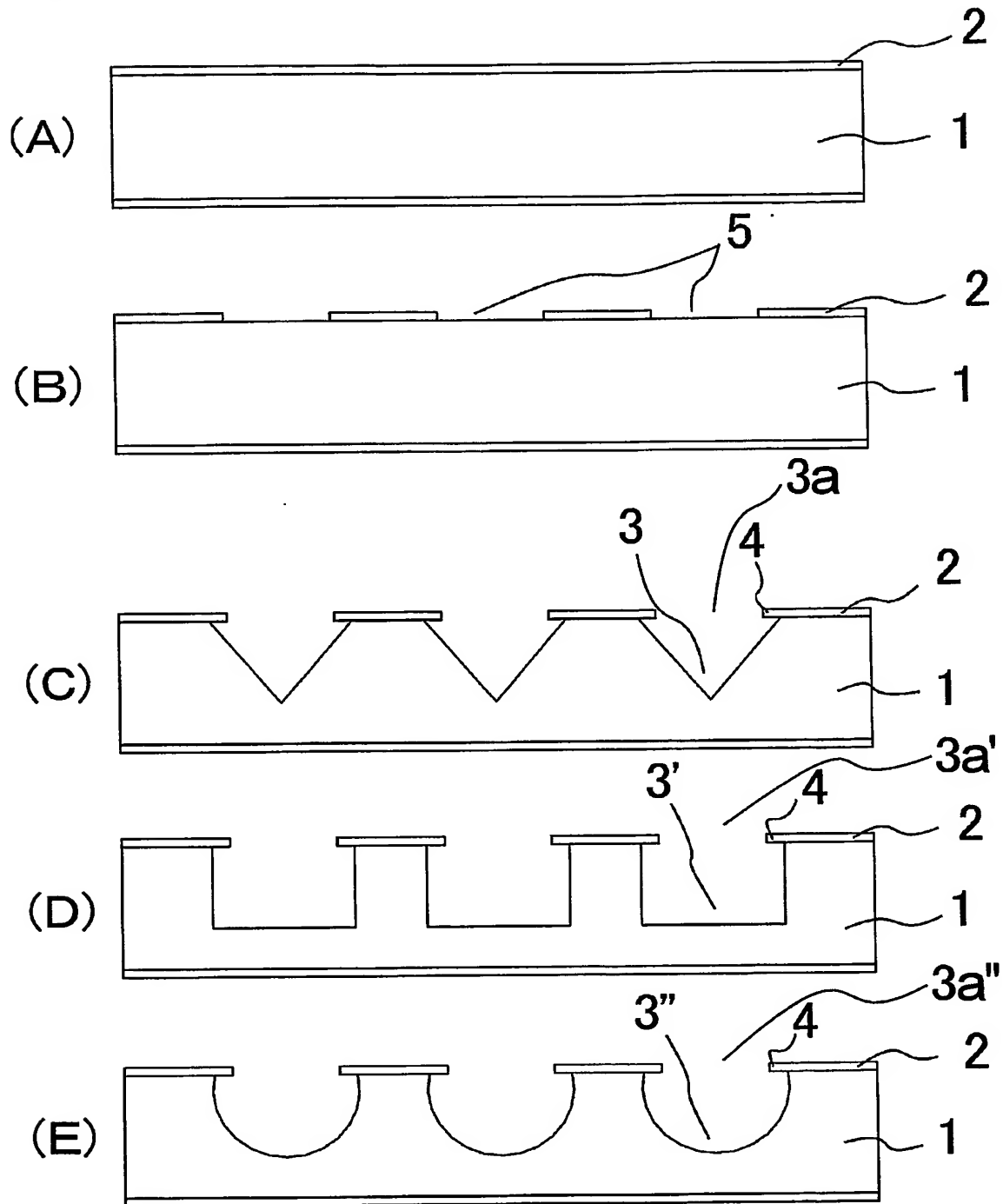
【書類名】 図面
【図 1】



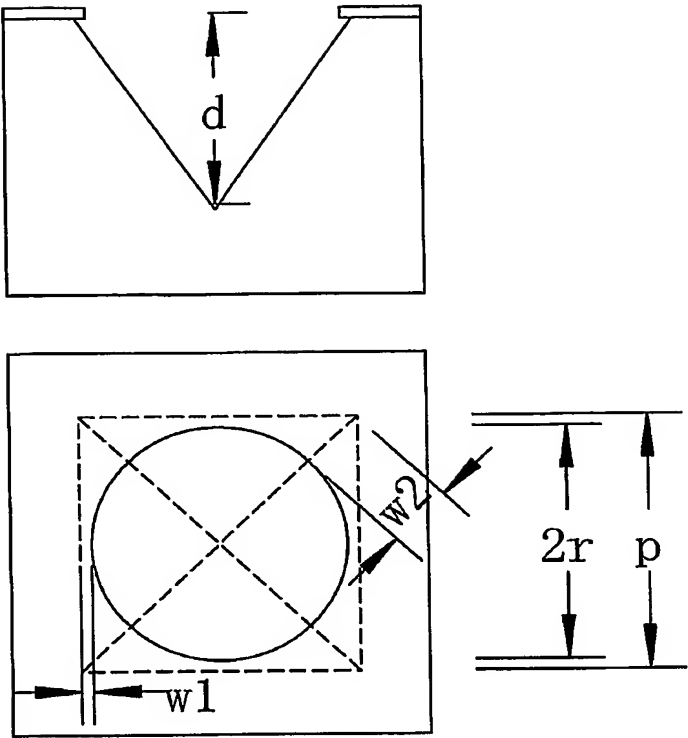
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 マイクロウエルに捕集されたリンパ球等の細胞が、その後の洗浄の際に、マイクロウエルから流出しにくいマイクロウエルアレイチップを提供すること。

【解決手段】 基板の一方の主表面に複数個のマイクロウエルを有し、前記マイクロウエルは、1つのマイクロウエルに1つの生体細胞のみが格納される形状及び寸法を有するマイクロウエルアレイチップ。前記マイクロウエルの開口部に、開口部を狭めるように突起部を有する。このマイクロウエルアレイチップの製造方法。基板の少なくとも一方の主表面に膜を形成する工程、形成した膜の上に、レジストを塗布する工程、前記レジスト面にマイクロウエルパターンを有するマスクを介して露光し、レジストの非硬化部分を除去する工程、前記膜及び基板の露出部をエッチングしてマイクロウエルアレイ形状の穴を空ける工程、及びレジストを除去する工程を有する。

【選択図】

特願 2 0 0 3 - 3 3 6 7 9 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 2 3 6 9 2 0]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 9 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

富山県富山市新総曲輪 1 番 7 号

氏 名

富山県

特願 2 0 0 3 - 3 3 6 7 9 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 2 4 1 3 2 7 8]

1. 変更年月日	2 0 0 2 年 1 1 月 1 4 日
[変更理由]	新規登録
住 所	富山県富山市明輪町 1 - 1 0 8 - 1 3 0 1
氏 名	村口 篤

特願 2 0 0 3 - 3 3 6 7 9 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 2 4 1 3 2 8 9]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 1 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

富山県富山市五福末広町 2 5 5 6 - 4 - 3 - 1 0 1

氏 名

岸 裕幸

特願 2 0 0 3 - 3 3 6 7 9 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 4 9 4 9 7]

1. 変更新月日 2 0 0 3 年 9 月 2 5 日

[変更理由] 新規登録

住 所 富山県富山市萩原 5 5 2 - 1 アクアマリン M 3 0 6 号

氏 名 時光 善温

特願 2 0 0 3 - 3 3 6 7 9 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 4 9 5 0 1]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 9 月 2 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

富山県富山市五福末広町 2 5 5 6 - 4 - 3 - 1 0 3

氏 名

近藤 佐千子

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.